

JONAS GOLART DA SILVA

**Estudo dos efeitos do veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre
o metabolismo e estresse oxidativo em fígado de ratos**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós Graduação em Farmacologia, Setor de
Ciências Biológicas, Universidade Federal do
Paraná, como requisito parcial à obtenção do
título de Mestre em Farmacologia.

CURITIBA

2009

JONAS GOLART DA SILVA

Estudo dos efeitos do veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre o metabolismo e estresse oxidativo em fígado de ratos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alexandra Acco

Co-orientação: Prof. Dr. Paulo Roberto Dalsenter

CURITIBA

2009

NOTA EXPLICATIVA

Esta dissertação é apresentada em formato alternativo, na forma de artigo científico para publicação, de acordo com as normas do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Paraná, constando de uma introdução ao assunto, objetivos do trabalho e um artigo abordando os experimentos realizados, com resultados, discussão e conclusões. O artigo foi formatado segundo as normas propostas pelo periódico *Toxicon*, ao qual o manuscrito será em breve submetido.

AGRADECIMENTOS

A Deus, nosso senhor por ser o meu ponto de orientação sobre minhas atitudes para com as outras pessoas e para comigo mesmo.

À Professora Alexandra Acco, pela orientação mesmo que à distância em alguns momentos, pela confiança depositada e paciência.

Ao Professor Paulo Roberto Dalsenter, meu co-orientador, gremista, peladeiro e amigo.

À minha esposa Alessandra, pessoa que amo e que me completa, motiva e apóia, e me fortalece em todos os momentos.

Aos meus pais, que mesmo à distância são sempre o meu alicerce de como ser enquanto pessoa e cidadão.

Aos meus colegas e amigos de departamento, pessoas fundamentais no meu processo de aprendizado nessa profissão maravilhosa: Juliana, Zaira, Nelson, Guilherme e Eliane.

À Bruna, nossa querida IC, que em muito contribuiu para o trabalho.

Ao Professor Adelar Bracht, do Departamento de Bioquímica da UEM, e às pessoas que me ajudaram nos experimentos de perfusão hepática: Luiz, Irene e Cidinha.

À minha amiga e “cirurgiã” Gabrielle (Gabi), pois sem ela a perfusão realmente não faria parte desse trabalho.

À Professora Sílvia Cadena, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, pela paciência e apoio, que foram fundamentais.

À Amanda do Rocio, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, por ser sempre essa pessoa prestativa e amiga.

Agradecimento especial ao “oxígrafo”, por funcionar nos dias em que eu mais precisei.

Enfim, a todos os amigos e amigas, distantes ou próximos, antigos ou novos, que sempre me estenderam a mão, se alegraram com minhas vitórias e aconselharam-me em meus erros.

À CAPES, pelo apoio financeiro durante o Mestrado.

RESUMO

Os venenos de serpentes apresentam diferentes atividades biológicas devido à sua complexa composição, representada principalmente por toxinas e enzimas. Estudos sobre suas ações em sistemas fisiológicos são importantes pela sua relevância clínica e pelo potencial para aplicações biotecnológicas. Este trabalho objetivou investigar os efeitos do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (*Cdt*) no fígado. Ratos Wistar foram inoculados por via intraperitoneal com solução salina (controle) ou veneno de *Cdt*. Depois de 3, 4 ou 6 horas avaliou-se: (a) função hepática [alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST)]; (b) estresse oxidativo [catalase (CAT), glutathiona reduzida (GSH), glutathiona S-transferase (GST) e lipoperoxidação (LPO)]; e (c) o metabolismo da alanina em fígado perfundido isolado. Ainda, o consumo de oxigênio mitocondrial foi avaliado *in vitro*. Os níveis plasmáticos de ALT e AST, e a atividade das enzimas GST e CAT apresentaram-se significativamente elevados em ratos inoculados com 300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de veneno de *Cdt*. Os níveis de LPO mostraram-se extremamente aumentados pelas doses de 100, 200 e 300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ do veneno, enquanto GSH não se alterou. O consumo de oxigênio por mitocôndrias intactas reduziu significativamente na presença do veneno. Os fígados em perfusão de ratos inoculados com dose de 1.500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de veneno apresentaram aumento da produção dos metabólitos lactato, piruvato e amônia diante da alanina (2,5 mM) como substrato. Estes resultados demonstram que o veneno crotálico altera significativamente as funções hepáticas. Os mecanismos estão relacionados, pelo menos em parte, com desequilíbrio na homeostase redox e prejuízo à atividade mitocondrial. Conseqüentemente, o veneno pode também modificar o metabolismo hepático.

Keywords: *Crotalus durissus terrificus*, veneno, fígado, estresse-oxidativo, metabolismo, hepatotoxicidade

ABSTRACT

Snake venoms present different biological activity because of its complex composition, represented mainly by toxins and enzymes. Studies about its action in physiological systems are important because of its clinical relevance and potential for biotechnological applications. This work aimed to investigate the effects of *Crotalus durissus terrificus* (*Cdt*) venom in the liver. Wistar rats were inoculated intraperitoneally with saline (control) or *Cdt* venom. After 3, 4 or 6 hours it was analyzed: a) hepatic function [alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST)]; b) oxidative stress parameters [catalase (CAT), reduced glutathione (GSH), glutathione S-transferase (GST) and lipoperoxidation (LPO)]; and c) the metabolism of alanine in isolated perfused liver. Also, *in vitro* mitochondrial oxygen consumption was measured. Plasmatic levels of ALT and AST, and GST and CAT activity presented significant increase in rats inoculated with 300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ *Cdt* venom. LPO levels were extremely increased by 100, 200 and 300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ venom doses, while GSH did not change. The oxygen consumption by intact mitochondria decreased in the presence of venom. Perfused livers from rats inoculated with 1,500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ venom produced more lactate, pyruvate and ammonia when alanine (2.5 mM) was the substrate for the metabolism. These results demonstrate that *Cdt* venom can change significantly the liver functions. The mechanisms are related, partly at least, with disequilibrium in the redox homeostasis and impairment of mitochondrial function. Consequently, venom can also modify the liver metabolism.

Keywords: *Crotalus durissus terrificus*, venom, liver, oxidative-stress, metabolism, hepatotoxicity

LISTA DE FIGURAS DA INTRODUÇÃO

| | |
|---|----|
| FIGURA 1. Filotaxia das principais serpentes <i>Crotalinae</i> do Brasil..... | 14 |
| FIGURA 2. Exemplar da espécie <i>Crotalus durissus terrificus</i> | 14 |
| FIGURA 3. Cadeia de reações para formação das ERO..... | 22 |

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO CIENTÍFICO

| | |
|---|----|
| FIGURE 1. Effects of <i>Crotalus durissus terrificus</i> on the plasma levels of hepatic enzymes..... | 34 |
| FIGURE 2. Effect of <i>Cdt</i> venom on CAT and GST activities, lipid peroxidation, and GSH levels..... | 35 |
| FIGURE 3. Effect of <i>Cdt</i> venom on oxygen consumption of uncoupled mitochondria..... | 36 |
| FIGURE 4. Time-courses of pyruvate, lactate and ammonia production of livers from rats injected with saline (controls) or <i>Cdt</i> venom..... | 39 |

LISTA DE TABELAS DA INTRODUÇÃO

| | |
|---|----|
| TABELA 1. Composição química do veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i> | 16 |
| TABELA 2. Principais EROs e defesas antioxidantes orgânicas..... | 23 |

LISTA DE TABELA DO ARTIGO CIENTÍFICO

| | |
|---|----|
| TABLE 1. Influence of the <i>Cdt</i> venom on hepatic alanine metabolism..... | 38 |
|---|----|

LISTA DE ABREVIATURAS DA INTRODUÇÃO

$\cdot\text{O}_2$, superóxido
ALT, alanina aminotransferase
AST, aspartato aminotransferase
CAT, catalase
Cdt, *Crotalus durissus terrificus*
CuZnSOD, cobre/zincos superóxido dismutase
DL₅₀, dose letal 50%
ERO, espécies reativas de oxigênio
FA, fosfatase alcalina
FADH, flavina adenina dinucleotídeo
GGT, gamaglutamil transferase
GSH, glutathiona reduzida
GSSH, glutathiona oxidada
GST, glutathiona S-transferase
H₂O₂, peróxido de hidrogênio
IRA, insuficiência renal aguda
L-NAME, L-arginina metil éster
LPO, lipoperoxidação
MnSOD, manganês superóxido dismutase
NADH, nicotinamida adenina dinucleotídeo
NO, óxido nítrico
O₂, oxigênio
PLA₂, fosfolipase A₂
SOD, superóxido dismutase
TNF α , fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE ABREVIATURAS DO ARTIGO CIENTÍFICO

ALT, alanine aminotransferase
AST, aspartate aminotransferase
BSA, bovine serum albumin
CAT, catalase
DTNB, 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)-sulfidryl
EGTA, ethylene glycol-bis(β -aminoethyl-ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
FCCP, carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone

GST, glutathione S-transferase

GSH, reduced glutathione

i.p., intraperitoneally

LPO, lipoperoxidation

HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO

| | |
|---|----|
| 1.1 <i>Crotalus durissus terrificus</i> e acidentes ofídicos | 13 |
| 1.2 Composição do veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i> | 15 |
| 1.3 Aspectos clínico-patológicos de acidentes crotálicos | 18 |
| 1.4 Envolvimento hepático nos acidentes ofídicos | 19 |
| 1.5 Estresse oxidativo e danos celulares | 20 |

2. OBJETIVOS

| | |
|---------------------------------|----|
| 2.1 Objetivo geral | 25 |
| 2.2 Objetivos específicos | 25 |

3. ARTIGO CIENTÍFICO

| | |
|---|----|
| 1. Introduction | 28 |
| 2. Materials and Methods | 29 |
| 2.1. Venom | 29 |
| 2.2. Animal treatments and collection of the samples | 29 |
| 2.3. Blood drawing for enzyme assays | 30 |
| 2.4 Oxidative stress | 30 |
| 2.5 Liver mitochondria isolation | 31 |
| 2.6 Isolated liver perfusion. | 32 |
| 2.7 Quantification of proteins | 33 |
| 2. 8 Statistical analysis | 33 |
| 3. Results | 33 |
| 3.1 Effects of Cdt venom on plasma levels of AST and ALT. | 33 |
| 3.2 Effects of Cdt venom on hepatic oxidative stress parameters | 34 |

| | |
|--|-----------|
| 3.3 Effects of Cdt venom on isolated rat liver mitochondria..... | 35 |
| 3.4 Effects of Cdt venom on alanine metabolism..... | 36 |
| 4. Discussion | 40 |
| Acknowledgements | 43 |
| References | 44 |
| 4. CONCLUSÕES..... | 48 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO..... | 49 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Crotalus durissus terrificus* e acidente ofídicos

Animais peçonhentos são aqueles que apresentam uma estrutura de defesa/ataque produtora de veneno, e que seja capaz de inoculá-la, através de dentes, pêlos ou ferrões. Nas serpentes, a formação do veneno se dá em glândulas especializadas que se comunicam com as estruturas inoculadoras. Sua composição apresenta uma grande variedade, que em sua maioria é de origem protéica. No caso das serpentes, estas apresentam ainda um órgão sensorial importante que é a fosseta loreal, um sensor térmico muito desenvolvido, situado entre a narina e os olhos. Através desse sensor, a serpente pode localizar a sua presa em ambientes escuros apenas pela captação do calor (STORER *et al.*, 2002; NOGUEIRA e SAKATE, 2004).

De grande interesse clínico e farmacológico estão as serpentes de duas famílias muito comuns no Brasil. A família *Viperidae* é constituída pela subfamília *Crotalinae*, com os gêneros *Bothrops* (jararaca ou urutu), *Crotalus* (cascavel) e *Lachesis* (surucucu); e pela família *Elapidae*, com sua subfamília *Elapinae* representada pela espécie *Micrurus* (coral verdadeira) (NOGUEIRA e SAKATE, 2004). A figura 1 representa esquematicamente a filotaxia das principais serpentes *Crotalinae* existentes no Brasil.

A serpente de interesse desse estudo apresenta apenas uma espécie no Brasil, a *Crotalus durissus*, que dependendo da região pode apresentar diferentes subespécies predominantes, como: a) *Crotalus durissus terrificus* (Figura 2), encontrada com maior frequência nas regiões Sul oriental e meridional; b) *Crotalus durissus collineatus*, encontrada nas regiões de Minas Gerais e Goiás; c) *Crotalus durissus cascavela*, encontrada na região de caatinga nordestina; d) *Crotalus durissus ruruima*, disposta na região Norte; e e) *Crotalus durissus marajoensis*, encontrada na ilha do Marajó (JORGE e RIBEIRO, 1992; PINHO e PEREIRA, 2001). Estas serpentes são popularmente conhecidas como: cascavel, boicininga, maracambóia ou maracá (SAKATE, 2002). Não possuem o hábito de atacar e denunciam sua presença pelo ruído do guizo ou chocalho, presente na cauda (JORGE & RIBEIRO, 1992; STORER *et al.*, 2002;).

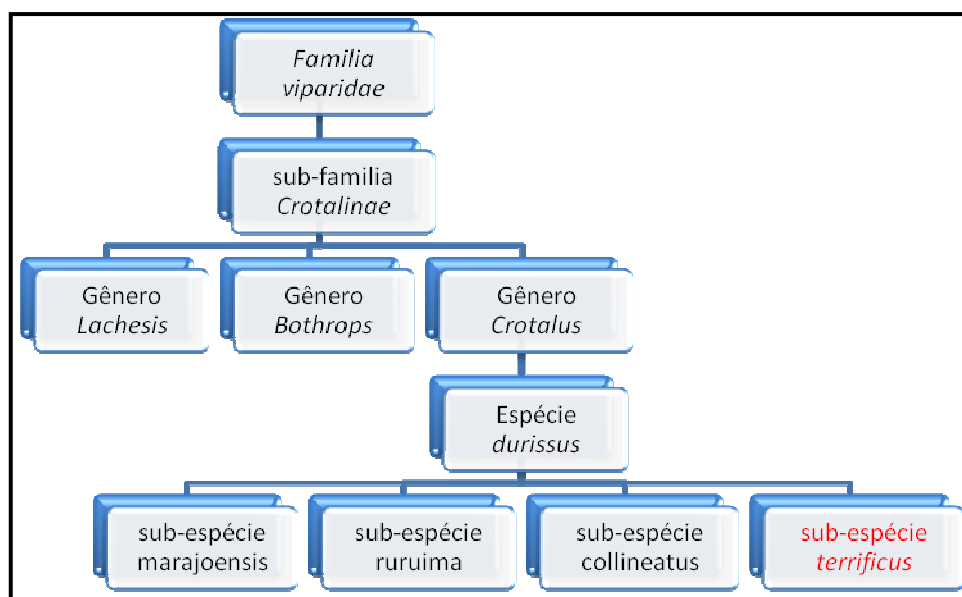


FIGURA 1. Filotaxia das principais serpentes *Crotalinae* do Brasil.



FIGURA 2. Exemplar da espécie *Crotalus durissus terrificus*. (Fonte: Autor, 2007)

Apesar de apresentarem uma distribuição geográfica bastante abrangente são observadas diferenças morfológicas e de comportamento entre os grupos de serpentes crotálicas, que preferem locais com ambientação seca, como pedras, terreno arenoso e vegetação rasteira (NOGUEIRA e SAKATE, 2004). Estas características facilitam acidentes em localidades de atividade agrícola. Os primeiros levantamentos sobre acidentes com ofídios foram realizados por Vital Brasil nos anos de 1897, 1899 e 1900, pesquisando o número de óbitos por picadas de serpentes peçonhentas no estado de São Paulo (BOCHNER e STRUCHINER, 2003). Mais recentemente, de acordo com dados no Ministério da Saúde, ocorreram cerca de 1.931 casos de acidentes crotálicos somente no ano de 2008 (FUNASA, 2008). Os acidentes estão intimamente ligados a épocas do ano em que há maior atividade humana no meio rural, como colheita e plantio, ou seja, nos meses de setembro a março nas regiões Sul e Sudeste e de janeiro a maio no Nordeste, enquanto que, na região Norte, não se observa sazonalidade marcante, ocorrendo acidentes de forma uniforme durante todo o ano (FUNASA, 2001).

Percentualmente, acidentes com ofídios crotálicos representam 19,09% do total de acidentes com serpentes no Brasil, com vítimas tendo preferencialmente entre 15 e 49 anos, do sexo masculino, sendo os pés e as pernas os principais pontos atingidos (72,4% dos casos), seguidos por mãos e antebraços (14,9% dos casos) (FUNASA, 2008). Acidentes ofídicos envolvendo espécies do gênero *Crotalus* são geralmente sérios e freqüentemente fatais na ausência de tratamento adequado e específico (BARRAVIERA *et al.*, 1989). Estes acidentes apresentam o maior índice de letalidade (1,56%) devido à freqüência com que evoluem para insuficiência renal aguda, que é a mais séria complicação do envenenamento crotálico (CUPO *et al.*, 1990; FUNASA, 2001).

1.2 Composição do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Cdt)

A toxicidade de venenos apresenta-se em tempos variados e com diferenças nas manifestações clínicas, que são decorrentes não apenas de suas propriedades específicas, mas também da toxicocinética (referente à velocidade de absorção e habilidade de penetrar em membranas e tecidos), da composição e potência. Parte destas variações dependem do tamanho, idade e hábito alimentar da cobra, bem como do clima e época do ano (CHIPPAUX *et al.*, 1991).

Via de regra, os venenos apresentam uma ação generalizada sobre células e tecidos, sendo que suas ações farmacológicas são determinadas pela quantidade de um ou mais constituintes específicos e biologicamente ativos que se acumulam num sítio de reconhecimento, onde são capazes de produzir lesão (RUSSEL *et al.*, 1996). O veneno do gênero *Crotalus* bioquimicamente apresenta uma composição diversificada e por isso, complexa, formada por compostos inorgânicos (cerca de 10% do peso seco total), que apresentam papel importante na ativação de algumas enzimas; e por compostos orgânicos, como enzimas hidrolíticas, proteolíticas e não-hidrolíticas, além de toxinas, responsáveis em grande parte pela toxicidade do veneno (BARRAVIERA, 1993). A composição detalhada do veneno de *Cdt* está mostrada na tabela 1.

Tabela 1. Composição química do veneno de *Crotalus durissus terrificus*.

| Compostos Inorgânicos | Compostos Orgânicos | | | |
|-----------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------|
| | Enzimas Hidrolíticas | Enzimas Não hidrolíticas | Enzimas Proteolíticas | Toxinas |
| Potássio | Fosfolipase A ₂ | L-aminoxigenase | Trombina | Crotoxina |
| Cálcio | Fosfodiesterase | | Calicreína | Crotapotina |
| Níquel | Fosfomonoesterase | | Endopeptidase | Convulxina |
| Cobalto | | | Exopeptidase | Giroxina |
| Sódio | | | Colagenase | Crotamina |
| | | | Elastase | Crotalfina |
| | | | Arginina éster-Hidrolase | |
| | | | Hialuronidase | |
| | | | NAD-nucleosidase | |

(Fonte: Adaptada de Beghini, 2001)

Vários componentes do veneno já foram purificados, e dentre eles pode-se destacar os seguintes (*apud* BEGHINI, 2001):

a) *crotoxina*: corresponde à principal fração do veneno. Foi isolada e cristalizada em 1938 por Slotta e Fraenkel-Conrat a partir do veneno total de *Crotalus durissus terrificus*. É uma neurotoxina (β -neurotoxina) de ação pré-sináptica, que inibe a liberação de acetilcolina, e ação pós-sináptica, bloqueando a resposta à acetilcolina através da estabilização dos receptores nicotínicos, deixando-os em estado inativo (COUSIN, 1997). A crotoxina afeta diretamente as células de músculos esqueléticos induzindo miotoxicidade sistêmica, evidenciada pela presença de mioglobinúria, mioglobinemia e por drástico aumento do nível sérico de creatina quinase, lactato desidrogenase e aspartato aminotransferase (AZEVEDO-MARQUES *et al.*, 1985);

b) *crotamina*: polipeptídeo isolado em 1956 por Gonçalves e Arantes que induz paralisia espasmódica em músculos esqueléticos de origem periférica. Em baixas concentrações é capaz de induzir um efeito analgésico (MANCIN *et al.* 1998);

c) *convulxina*: toxina responsável por apresentar um quadro clínico de perda de equilíbrio, alterações gastrintestinais, convulsões e alterações visuais logo após sua inoculação. Hematologicamente, induz agregação plaquetária com subsequente isquemia cerebral, podendo levar a convulsões, freqüentemente seguidas de morte (PRADO-FRANCESCHI e BRAZIL, 1981);

d) *giroxina*: componente protéico tóxico não-letal, com bioquímica semelhante à trombina, que age sobre o sistema nervoso central, levando à lesão labiríntica (SEKI *et al.*, 1980). Esta lesão foi chamada em ratos de “Síndrome de Girotoxina”, caracterizada por períodos de hipoatividade alternados com hiperexcitação (ALEXANDER *et al.*, 1988).

e) *crotalfina*: componente peptídico recentemente identificado, com estrutura semelhante ao componente não tóxico crotapotina. A crotalfina demonstrou forte ação antinociceptiva mediada pela ativação de receptores opióides tipo κ (KONNO *et al.*, 2008), superando inclusive drogas analgésicas padrão em modelo de dor neuropática (GUTIERREZ *et al.*, 2008).

1.3 Aspectos clínico-patológicos de acidentes crotálicos

Os efeitos deletérios do veneno de *Cdt* estão relacionados com sua constituição, mencionada acima. O quadro clínico é representado por alterações discretas locais, como eritema, edema, ligeira dor e paralisia, que, no entanto, podem evoluir para necrose local (SCHMIDT *et al.*, 1976; CUPO *et al.*, 1990; PINHO *et al.*, 2004). As modificações sistêmicas precoces abrangem mal-estar, cefaléia intensa, prostração, sudorese, náuseas, vômitos sonolência ou inquietação e sensação de “boca seca”. O quadro então evolui para mialgia generalizada, fáceis miastêmicas, visão turva e insuficiência renal aguda. Em alguns casos pode ocorrer insuficiência respiratória (BARRAVIERA, 1993; PINHO e PEREIRA, 2001). Ainda, reação inflamatória intensa está presente, com liberação de mediadores inflamatórios, como prostaglandinas, citocinas, bradicinina, frações do complemento e fator de agregação plaquetária (BARRAVIERA *et al.*, 1995).

O efeito danoso mais grave é o desenvolvimento de insuficiência renal aguda (SCHMIDT *et al.*, 1976; CUPO *et al.*, 1990; PINHO *et al.*, 2004). A crotoxina provoca várias alterações renais, enquanto a girotóxina produz menos efeito e a convulxina não afeta a função renal; assim, a crotoxina é a principal responsável pela nefroxicidade do veneno *Cdt* (MARTINS *et al.*, 2002).

O efeito renal é, pelo menos em parte, provocado pela ação da fosfolipase A₂ (PLA₂) presente no veneno, que incrementa a formação de prostaglandinas e leucotrienos, causando um aumento na permeabilidade celular, edema e queda na pressão sangüínea, por ação direta nos túbulos e glomérulos. Indiretamente, a liberação de outros mediadores provenientes de macrófagos ativados pelo veneno crotálico contribui para esse efeito (MARTINS *et al.*, 1998; MONTEIRO *et al.*, 2001; MARTINS *et al.*, 2003). Como os efeitos lesivos na perfusão dos rins e taxa de filtração glomerular podem ser minimizados por dexametasona (MARTINS *et al.*, 2003), talidomida e pentoxifilina, há uma possível participação de eicosanóides e TNF- α na gênese da insuficiência renal induzida por veneno crotálico (MARTINS *et al.*, 2004). O uso de indometacina não inibe, no entanto, os efeitos sobre a pressão de perfusão renal, indicando que os mecanismos envolvidos nas ações vasculares do veneno são múltiplos (MARTINS *et al.*, 2003). Ainda, a apoptose de células

vasculares endoteliais induzida por veneno *Cdt* pode ser sinalizada pela integrina beta4, através do aumento da expressão de p53 (ZHAO *et al.*, 2004).

O índice de vítimas de acidentes crotálicos que desenvolvem insuficiência renal aguda (IRA) é alto, cerca de 29%, sendo que destes, 10% evoluem para o óbito. A demora no tratamento com soro antiofídico e valores de creatina quinase maiores que 2.000 U.L⁻¹ são fatores de risco para o desenvolvimento de IRA, enquanto a manutenção da taxa de diurese acima de 90 mL.h⁻¹ na admissão das vítimas é um fator favorável no tratamento, evitando complicações renais (PINHO *et al.*, 2005). Assim, além do tratamento dos quadros sistêmicos característicos, é de fundamental importância a soroterapia o mais brevemente possível, para diminuir as seqüelas decorrentes das ações das diversas toxinas que compõem o veneno.

1.4 Envolvimento hepático nos acidentes crotálicos

Em contrapartida aos bem-conhecidos efeitos renais do veneno crotálico, o fígado, principal órgão envolvido no metabolismo de compostos xenobióticos, foi menos estudado e as análises feitas com este órgão abrangem, basicamente, histopatologia e bioquímica sérica (FRANÇA, 2004), embora o comprometimento do fígado, bem como do coração em acidentes com *Cdt*, já tenha sido relatado (BANCHER *et al.*, 1973; CUPO *et al.*, 1990).

Experimentalmente foi demonstrado em camundongos que o veneno de *Crotalus vegrandis* induz aumento de formações lipídicas em hepatócitos e significativa vacuolização nas áreas citoplasmáticas que limitam o espaço de Disse. As mitocôndrias hepáticas mostraram-se pleomórficas, com cristas escassas ou ausentes, e os sinusóides com aderência de hemácias (RODRIGUEZ-ACOSTA *et al.*, 1999). Um caso relatado de paciente picado por *Crotalus durissus terrificus* que evoluiu para óbito, evidenciou fígado com degeneração hidrópica e lesões mitocôndriais. Os danos hepáticos podem ter sido causados pelo efeito direto do veneno nas mitocôndrias e pela ação de citocinas nos hepatócitos, especialmente a interleucina-6 (BARRAVIERA *et al.*, 1995). Além disso, exames histopatológicos de pacientes picados e que morreram mostraram extensa necrose hepática (BARRAVIERA *et al.*, 1989). A extensão das lesões microscópicas é variável com o tempo decorrido após a picada e a quantidade de veneno inoculada, podendo ocorrer aumento de células de Kupffer, aumento do infiltrado inflamatório,

congestão e espessamento endotelial até 12 horas após a picada ou inoculação do veneno (FRANÇA, 2004).

FRANÇA (2004) estudou as alterações hepáticas induzidas pelo veneno crotálico em ratos em diferentes doses (100, 200 e 300 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, via intramuscular) e em diferentes tempos após a inoculação (3 - 12 h), e observou que os níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e gamaglutamil transferase (GGT) elevaram-se significativamente a partir da terceira hora após a inoculação, de maneira dose-dependente. Os níveis de fosfatase alcalina (FA) evidenciaram-se aumentados 12 horas após a inoculação, enquanto que os níveis de bilirrubina total, direta e indireta não sofreram quaisquer alterações significativas. Considerando que as enzimas avaliadas no referido estudo são indicativos laboratoriais rotineiros da função hepática, fica clara a possibilidade e a validade de mensurar o grau de comprometimento do fígado em acidentes crotálicos através dessas dosagens. Estes dados reforçam os achados de BANCHER *et al.* (1973), que demonstraram a afinidade que o veneno *Cdt* tem com tecidos nervosos e hepáticos em ratos. O tecido hepático pode fixar aproximadamente 15 vezes a DL_{50} de veneno por grama de tecido, embora altas concentrações foram também encontradas em tecidos renais e musculares.

Alguns dos efeitos do veneno crotálico no fígado podem ser atribuídos à ação mitocondrial. Isoformas da fosfolipase A_2 (PLA_2) do veneno, denominadas F1, F2 e F3, induzem intenso *swelling* mitocondrial como resultado do seu ataque sobre a bicamada lipídica e liberação de ácidos graxos livres, o que pode ocasionar, adicionalmente, inibição da respiração celular e efeito desacoplador (VALENTE *et al.*, 1998). Em função da ação sobre membranas e mitocôndrias é de se esperar que o veneno crotálico tenha atividade oxidativa e que aumente a produção de espécies reativas de oxigênio, efeitos que contribuem para mais danos celulares e apoptose.

1.5 Estresse oxidativo e danos celulares

A sinalização molecular que intermedeia a toxicidade do veneno crotálico envolve, além do processo inflamatório, as vias nitrérgicas, sendo ambos relacionados à geração de espécies reativas. O veneno estimula a produção de óxido nítrico (NO) e de peróxido de hidrogênio (SAMPAIO *et al.*, 2003). Assim, o

uso de inibidores da NO-sintase (L-NAME, aminoguanidina e 7-nitroindazol) minimiza a mionecrose induzida pela crotoxina (MIYABARA *et al.*, 2004).

Normalmente, em torno de 95 a 98% do oxigênio absorvido pelos organismos aeróbicos é reduzido, formando-se água na cadeia respiratória através do transporte de elétrons nas mitocôndrias, bem como no retículo endoplasmático. Neste local, o sistema enzimático citocromo, no processo de fosforilação oxidativa, procede a redução tetravalente do O₂ pelo sistema citocromo oxidase, fornecendo simultaneamente quatro elétrons para o oxigênio, que se reduz diretamente à água:

$$\text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^- = 2\text{H}_2\text{O}$$

As fontes que cedem os cátions de hidrogênio e os elétrons para a reação são, basicamente, o NADH, o FADH e a ubiquinona ou coenzima Q. Todavia, de 2 a 5% do O₂ é reduzido univalentemente, processo em que uma molécula recebe apenas um elétron, o qual vai ocupar um dos orbitais externos, ao mesmo tempo em que o outro continua não parelhado, produzindo intermediários altamente reativos, denominados Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), que algumas vezes constituem os radicais livres. Forma-se então a primeira espécie tóxica reativa de oxigênio, o superóxido ($\cdot\text{O}_2$), conforme esquema: $\text{O}_2 + \text{e}^- = \cdot\text{O}_2$ (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).

A formação de ERO se dá primeiramente pelo radical superóxido, que pode ser dismutado em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) ou mesmo através de ação catalítica, pela atuação da enzima superóxido dismutase (SOD). No organismo existem duas SOD principais, uma citoplasmática (CuZnSOD) e outra mitocondrial (MnSOD). A importância da SOD pode ser demonstrada pelo fato de ser a enzima mais abundante e a quinta proteína mais abundante no organismo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989). A figura 3 demonstra esquematicamente como ocorre a formação de várias ERO.

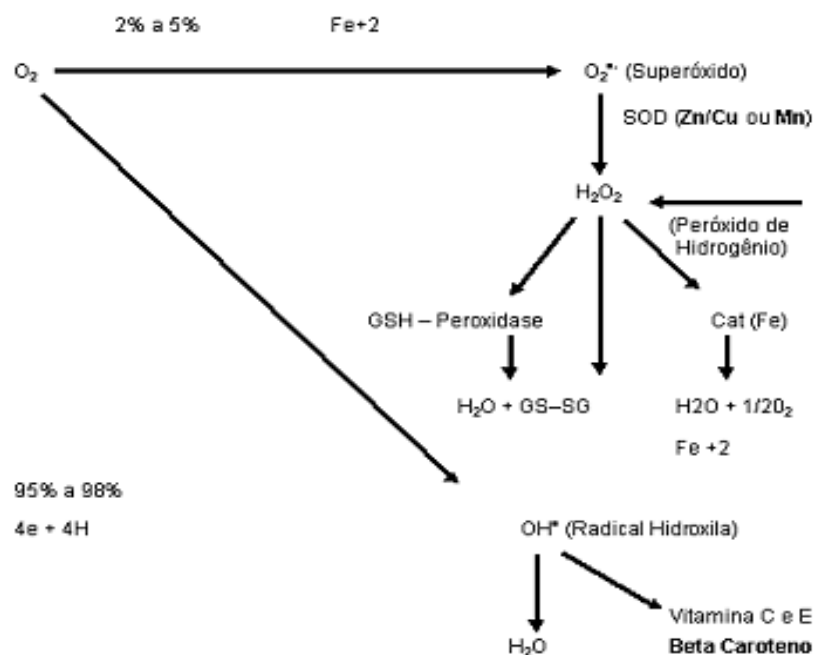


FIGURA 3. Cadeia de reações para formação das ERO. (Fonte: SIES, 1991)

O estresse oxidativo pode ocorrer por desequilíbrio entre a formação de ERO e os componentes endógenos antioxidantes, que têm função de “varrer” radicais livres (GUTTERIDGE e MITCHELL, 1999). Inadequadas defesas antioxidantes podem ocorrer por alterações na atividade enzimática da SOD, catalase (CAT) e/ou por redução nos níveis de glutathione. A glutathione tem importante função no sistema redox, sendo suas formas mais comuns a reduzida (GSH) e a oxidada (GSSH) (BILSKA et al., 2007). A enzima responsável pela interconversão destas duas formas é a glutathione S-transferase (GST), que assim como seus produtos, é um biomarcador do estresse oxidativo tecidual. Existe, ainda, uma série de outros antioxidantes não-enzimáticos que participam da defesa contra as espécies reativas do oxigênio nos sistemas biológicos, como por exemplo, ubiquinona, ceruloplasmina, ácido úrico, taurina, flavonóides e outros compostos fenólicos de origem vegetal (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989; SIES, 1991). A tabela 2 evidencia as principais defesas antioxidantes orgânicas contra ERO.

Tabela 2. Principais ERO e defesas antioxidantes orgânicas.

| ERO | Antioxidantes | |
|--|--|---|
| | Endógenos | Exógenos |
| Superóxido ($\cdot\text{O}_2$) | Superóxido dismutase (SOD) a) citoplasmática: ZnCu b) mitocondrial: Mn | Vitaminas, manganês, zinco, cobre, EDTA, picnogenol |
| Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) | Catalase Fe_2^+ | |
| Peróxido lipídico ($\cdot\text{COOH}$) | Glutathione peroxidase (GPx), selênio, cisteína | Vitamina E, selênio |
| Radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) | | Vitamina C, EDTA, picnogenol, dimetil sulfóxido, manitol, ácido dimercaptosuc- cínico |
| Oxigênio singlet ($^1\text{O}_2$) | | Betacaroteno |

(Fonte: adaptada de SIES, 1991)

Uma complicação clínica comum em pacientes picados por *Cdt* é a rabdomiólise (BUCARETCHI et al., 2002; CUPO et al.; 1990; YAMASAKI et al., 2008), que foi previamente relacionada com estresse oxidativo (YAMASAKI et al., 2008). Nesta situação, a degradação da mioglobina resulta na liberação de ferro, que catalisa a formação de ERO, iniciando lipoperoxidação (LPO) e aumentando o desequilíbrio redox. O estresse oxidativo é, portanto, um fator relacionado a lesões teciduais em acidentes por *Cdt*.

O presente trabalho fundamenta-se nos aspectos supracitados e na ausência de dados científicos enfocando a ocorrência de mudanças no metabolismo e no grau de estresse oxidativo hepático secundários à ação do veneno crotálico. Para tanto, realizou-se um estudo empregando ratos como modelos animais de experimentação em vários protocolos (ensaio enzimáticos, perfusão monovascular de fígado isolado e avaliação da funcionalidade de mitocôndrias), os quais permitiram mensurar de forma seletiva parâmetros relacionados à fisiologia e à bioquímica hepática, a fim de

auxiliar na interpretação e conhecimento do envenenamento crotálico do organismo *in toto*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Este trabalho tem como principal objetivo estudar os efeitos do veneno bruto da serpente *Crotalus durissus terrificus* sobre o fígado de ratos, avaliando o metabolismo hepático, suas relações com os processos de estresse oxidativo e sua influência sobre a atividade respiratória mitocondrial.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar o grau de comprometimento da função hepática através da dosagem de marcadores plasmáticos da função hepática (ALT e AST);

Avaliar os parâmetros enzimáticos relacionados a estresse oxidativo pelos níveis ou atividade de SOD, GST, GSH, além de peroxidação lipídica (LPO);

Avaliar a ação do veneno sobre as vias metabólicas básicas, como gliconeogênese, glicólise, ureagênese, amoniogênese e consumo de oxigênio, através de perfusão hepática monovascular;

Avaliar pela técnica de isolamento e respiração mitocondrial a interferência do veneno *Cdt* sobre complexos mitocondriais.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

Effects of the *Crotalus durissus terrificus* snake venom on hepatic metabolism and oxidative stress

Jonas Golart da Silva¹, Bruna da Silva Soley¹, Vanessa Gris¹, Amanda do Rocio Andrade Pires², Sílvia Maria Suter Correia Cadena², Gabrielle Jackin Eler³, Aparecida Pinto Munhos Hermoso³, Adelar Bracht³, Paulo Roberto Dalsenter¹, Alexandra Acco^{1*}

1- Department of Pharmacology, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil;

2- Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil;

3- Department of Biochemistry, State University of Maringá, Paraná, Brazil.

* Corresponding author

Phone: +55 (41) 3361-1743

Email: aleacco@ufpr.br

Address: UFPR, Biological Science Sector, Department of Pharmacology, Jardim das Américas, Curitiba, Paraná, Brazil. Cx. P. 19031. Zip code 81530-990.

Running Title: Hepatotoxicity of the *Crotalus* snake venom

Financial support: CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)

Abstract

Snake venoms present different action mechanisms because of their complex composition, represented mainly by toxins and enzymes. Studies about their action in physiological systems are important because of their clinical relevance and potential for biotechnological applications. This work aimed to investigate the effects of the *Crotalus durissus terrificus* (*Cdt*) venom in the liver. Wistar rats were inoculated intraperitoneally with saline (control) or *Cdt* venom. After 3, 4 or 6 hours the following parameters were analyzed: (a) hepatic function [alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST)]; (b) oxidative stress parameters [catalase (CAT), reduced glutathione (GSH), glutathione S-transferase (GST) and lipoperoxidation (LPO)]; and (c) the metabolism of alanine in the isolated perfused liver. Also, *in vitro* mitochondrial oxygen consumption was measured. Plasma activities of ALT, AST, GST and CAT presented significant elevation in rats inoculated with 300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ *Cdt* venom. LPO levels were enormously increased by venom doses of 100, 200 and 300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, while GSH was not change. The oxygen consumption by intact mitochondria was also decreased by the venom. Perfused livers from rats inoculated with 1,500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ venom showed increased production of lactate, pyruvate and ammonia when alanine (2.5 mM) was the metabolic substrate. These results demonstrate that the *Cdt* venom can produce significant changes in the liver functions. The mechanisms are related, partly at least, to the disequilibrium in the redox homeostasis and to the impairment of the mitochondrial functions. Consequently, the venom can also modify liver metabolism.

Keywords: *Crotalus durissus terrificus*, venom, liver, oxidative-stress, metabolism, hepatotoxicity

1. Introduction

Accidents with poisonous animals are the most frequently reported ones in rural areas of Brazil. According to the Brazilian Ministry of Health (2001) 81,611 accidents occurred between 1990 and 1993, with an average of approximately 20,000 cases per year. The most common victims are males between 15 and 49 years old, and the bites preferably occur in feet and legs (70.8%), followed by the hands and forearms (13.4%). Accidents caused by the genus *Crotalus* represent 6.2% of all accidents involving snakes in Brazil, reaching the higher level of mortality, around 1.87% of the bite cases (FUNASA, 2001).

The venom of the *Crotalus durissus terrificus* possesses a great variety of inorganic compounds such as sodium, calcium, potassium, magnesium, traces of iron, cobalt, zinc and nickel. Some of these ions have an important role in the activation of enzymes and organic compounds of the venom, such as: (a) hydrolytic and proteolytic enzymes (phospholipase A₂, phosphodiesterases, phosphomonoesterase, thrombin, callicrein, endopeptidase, exopeptidase, collagen-ase, elastase, arginine ester hydrolase, hyaluronidase, NAD⁺-nucleo-sidase); and (b) non-hydrolytic enzymes (L-aminooxidases and the toxins crotoxin, crotapotin, giroxin and convulxin) (Beghini, 2001).

The manifestations after a *C.d. terrificus* bite include neurotoxicity, myotoxicity, nephrotoxicity, edematous reactions, and platelet aggregation (Martins et al., 2002a). The toxins are responsible for most of the effects developed in the *Crotalus* intoxication (Miyabara et al., 2006). The renal effects are induced mainly by crotoxin, a neurotoxin composed by two subunits, namely crotapotin and phospholipase A₂ (de Oliveira et al., 2003, Valente et al., 1998). The last one increases the prostaglandins and leukotrienes production, causing edema, reduction in blood pressure and nephron damages. Additionally, other mediators released by macrophages activated by the venom contribute to nephrotoxicity (Martins et al., 1998, Martins et al., 2002b, Martins et al., 2003, Monteiro et al., 2001). Oxidative stress should also be cited as an important factor related to kidney impairment and acute renal failure (Yamasaki et al., 2008).

The renal actions of the *C.d. terrificus* venom are largely studied, while the hepatic effects have not been deeply evaluated. There are reports, however, showing hepatic histological alterations, increased plasma levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) and impaired mitochondrial functions (Barraviera *et al.*, 1989, Barraviera *et al.*, 1995). The reports include a case with liver damage which evolved to obit (Barravieira *et al.*, 1995). It is important, however, to reach more deeply into the consequences of *C.d. terrificus* venom intoxication for the liver because this organ is notoriously involved in the biotransformation of xenobiotics and in the struggle against oxidative stress. For this reason the present work was designed to investigate more extensively the effects of the *Crotalus durissus terrificus* venom on the rat liver, by measuring enzyme activities, mitochondrial respiration, perfused liver metabolism and oxidative stress parameters.

2. Material and Methods

2.1 Venom

Crotalus durissus terrificus (Cdt) snake venom from three sources was used. They were gifts from the Biochemistry Department of the Federal University of Uberlândia (Uberlândia, Brazil), the Toxicological Information Center (CIT-Tox, Porto Alegre, Brazil) and the Immunobiological Production Center (CPPI, Piraquara, Brazil). The lyophilized venom samples were kept at -70°C and dissolved in a saline solution just before the experiments. To minimize possible differences in activity of the venoms from the three sources, the protein concentration was measured (item 2.7) and the venom doses were calculated based on this concentration.

2.2 Animal treatments and sample collections

Adult male Wistar rats weighing 180-230 g were used in all experiments. Animals were housed at $22 \pm 1^\circ\text{C}$ under a 12 h light-dark cycle, and had free access to standard laboratory food (Nuvital®, Colombo, Brazil) and tap water. The experiments were conducted following the recommendation of the Brazilian Law 6638 for the scientific management of animals, and the procedures were approved by the

Institutional Animal Ethics Committee (CEEA, certificate 280). The animals were intraperitoneally (i.p.) injected with 100, 200, 300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ *Cdt* venom or equivalent volume of saline solution (control) for analysis of parameters indicating liver injury and oxidative stress. In these rats, blood was collected at 3 and 6 h after the venom injection for the determination of AST and ALT, while livers were collected 3 h *post*-venom for the determination of catalase, reduced glutathione, glutathione S-transferase and lipoperoxidation. Isolated liver perfusion was performed 4 h after the inoculation of 300, 700 or 1,500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ venom dose.

2.3 Blood drawing for enzyme assays

Blood samples (directly from the cava vein) were obtained from rats anesthetized by i.p. injection of sodium thiopental (60 $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$). Plasma samples were separated after blood centrifugation at 3,000 x *g* for 10 min. These samples were used for the measurement of two indicators of liver function, the enzymes alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), by means of commercial kits (Laborclin®, Pinhais, Brazil).

2.4 Oxidative stress

In order to check the influence of the venom in the oxidative stress generation and antioxidants mechanisms, the following biomarkers were measured in the liver: catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), reduced glutathione (GSH) and lipoperoxidation (LPO).

2.4.1 Determination of catalase and glutathione S-transferase activities

For biochemical analyses of these enzymes, liver samples were homogenized in phosphate buffer pH 6.5. Catalase activity [$\text{nmol min}^{-1} (\text{mg protein}^{-1})$] was measured according to the procedure described by Aebi (1984). The reaction was monitored by spectrophotometer for 60 seconds at 240 nm. GST activity ($\mu\text{mol mg protein}^{-1}$) was

measured in microplate following the method of Habig et al. (1974), which assessed the linear increase in molar extinction at 340 nm.

2.4.2 Determination of reduced glutathione

Liver GSH levels were measured using the method described by Sedlak & Lindsay (1968), which quantifies the formation of DTNB (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)-sulfidryl) groups by a colorimetric assay. A sample of tissue (100 mg) was homogenized in 900 μ L of 0.1 M phosphate buffer pH 6.5 and the supernatant was incorporated with DTNB as reaction mixture. Absorbance was measured at 412 nm in a microplate reader using reduced glutathione as an external standard.

2.4.3 Determination of lipid peroxidation

The lipid peroxidation rate was measured by the FOX-2 method (Jiang et al., 1991), which quantifies the formation of lipid hydroperoxides during peroxidation. Liver samples were homogenized in methanol, at a ratio of 1:5, centrifuged at 5,000 \times g for 5 min at 4 °C, and read in spectrophotometer at 560 nm.

2.5 Liver mitochondria isolation

Healthy and untreated rats were starved for 12 h before being killed by decapitation. Mitochondria were immediately isolated from the liver by differential centrifugation (Voss *et al.*, 1961) using an extraction medium consisting of 250 mM D-mannitol, 10 mM HEPES-KOH, pH 7.2, 1 mM EGTA and 0.1 g% BSA. Oxygen uptake was measured polarographically using a Clark-type electrode connected to an oxygraph at 28 °C in a 1.3 mL closed thermostatically controlled water-jacketed chamber under magnetic stirring. The standard incubation medium was 125 mM D-mannitol, 65 mM KCl, 10 mM HEPES-KOH pH 7.2, 0.1 mM EGTA and 0.1% BSA. The medium was supplemented either with 2.5 μ M rotenone, 11 mM sodium succinate and 1.0 mg of mitochondrial protein or with 2.0 mM P_i , 0.2 mM ADP, 5.0 mM sodium glutamate, 0.5 mM sodium malate and 2.0 mg of mitochondrial protein.

State 3 and 4 respiration rates were measured after the addition of substrates in the presence (state 3) and after the exhaustion (state 4) of ADP, and were expressed as nmol of oxygen consumed per minute per mg of mitochondrial protein. The respiratory control coefficient (RCC) was calculated as the state 3 and 4 respiration ratio (Chance & Williams, 1955). Only mitochondrial preparations with a respiratory control above 4.0 were used. The effects of *Cdt* venom at concentrations of 150, 300, and 600 nM on oxygen consumption were measured in intact and uncoupled mitochondria by addition of uncoupler FCCP (1.0 μ M).

2.6 Isolated liver perfusion

For investigating the metabolic effects of the *Crotalus durissus terrificus* venom on the liver, monovascular perfusion of the rat liver was performed. The perfusion system was built based on the system originally described by Scholz *et al.* (1973). The animals were fasted for 20 h but received water ad libitum before the i.p. administration of the *Cdt* venom (300, 700, 1,500 μ g·Kg⁻¹) or saline solution. The surgery for liver isolation took place 4 h later, under anesthesia induced by sodium thiopental (60 mg·Kg⁻¹, i.p.). After stabilization of oxygen consumption with the liver in the perfusion system platform, samples of the perfusate were collected every two minutes up to 60 minutes. At 10 minutes, 2.5 mM alanine were added to the perfusion liquid (Krebs-Henseleit bicarbonate pH 7.4) as the substrate source for gluconeogenesis, ureagenesis and ammoniogenesis. The perfusate samples were maintained in ice until the assays of glucose, ammonia, urea, lactate and pyruvate. All these metabolites were assayed employing standard enzymatic procedures (Bergmeyer, 1974), with spectrophotometric measurements. Additionally, the venous concentration of oxygen was polarographically followed employing a teflon-shielded platinum electrode adequately positioned in a plexiglass chamber at the exit of the perfusate (Bracht & Ishii-Iwamoto, 2003). Metabolic rates were calculated from input-output differences and the total flow rates were referred to the wet weight of the liver.

2.7 Quantification of proteins

The quantification of proteins in the venom and in liver samples was performed according to the Bradford method (Bradford, 1976). The reaction was accomplished at 595 nm in microplate reader. The concentration of protein in the isolated liver mitochondria suspensions was determined according to Lowry *et al.* (1951). In both methods bovine serum albumin (BSA) was used as standard.

2.8 Statistical analysis

Statistical analyses were performed using analysis of variance (ANOVA) with Tukey test as a post-hoc testing in the Graph Pad Prism 5.0 program. The data of the liver perfusion experiments were analyzed by two-way ANOVA with Bonferroni test as a post-hoc. Differences were considered significant when $p \leq 0.05$. The results were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM).

3. Results

3.1 Effect of the *Cdt* venom on plasma levels of AST and ALT

The plasma levels of ALT and AST were measured in order to check the time-courses of the *Cdt* venom hepatotoxicity. The venom induced significant increases in the plasma levels of ALT and AST, as shown in figure 1 (A, B). Both enzymes were found higher in the plasma of the group inoculated with 300 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ venom. ALT levels were elevated by 48% and 59% at 3 and 6 hours after the venom administration, respectively, when compared with control rats. The AST plasmatic levels reached 53% and 136% of elevation, respectively, at the same time points. The dose of 100 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ induced a statistically significant elevation of ALT at 6 hours. The dose of 200 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ was able to elevate the AST levels by 51% after 3 hours. These data suggest that all the *Cdt* venom doses that were tested were likely to damage hepatocytes few hours after their administration.

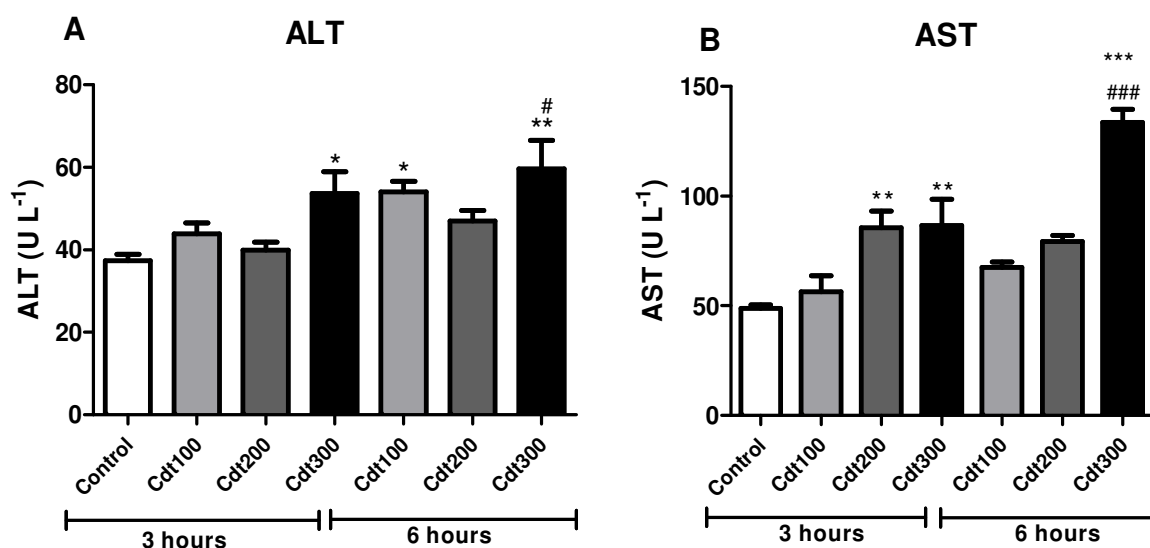


Figure 1. Effects of *Crotalus durissus terrificus* on the plasma levels of hepatic enzymes. Animals were injected with saline (control) or *Cdt* (100, 200 or 300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and blood was collected 3 or 6 hours later for measurement of alanine aminotranferase (ALT, panel A) and aspartate aminotranferase (AST, panel B) in plasma. Bars represent the means \pm mean standard errors ($n=7$). Symbols: *, statistically different from the vehicle-injected group; #, statistically different from the other *Cdt* dose (* $p\leq 0.05$, ** $p\leq 0.01$, *** $p\leq 0.001$, # $p\leq 0.05$, ### $p\leq 0.001$).

3.2 Effects of the *Cdt* venom on hepatic oxidative stress parameters

Considering the elevation of the plasma AST and ALT levels already at 3 hours after venom inoculation, the possible effects of the *Cdt* venom on oxidative stress parameters were investigated at this time. For this purpose the activities of CAT and GST and the levels of GSH and LPO were measured in the liver. The *Cdt* venom induced an increase in the CAT activity (Figure 2A). The highest CAT activity ($484.3 \pm 28.4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$) was observed in the group inoculated with $300 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ venom. This venom dose also induced a significant increase in the GST activity ($\approx 400\%$), while the other two doses were ineffective (Figure 2B). Despite the elevation of the GST activity, the levels of reduced glutathione (GSH) were not changed by the venom (Figure 2C). Lipoperoxidation after the venom inoculation increased enormously with all the doses tested, reaching values 493%, 627% and 514% above

the control ($0.48 \pm 0.11 \mu\text{mol mg protein}^{-1}$), respectively, with 100, 200 and 300 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ *Cdt* venom (Figure 2D).

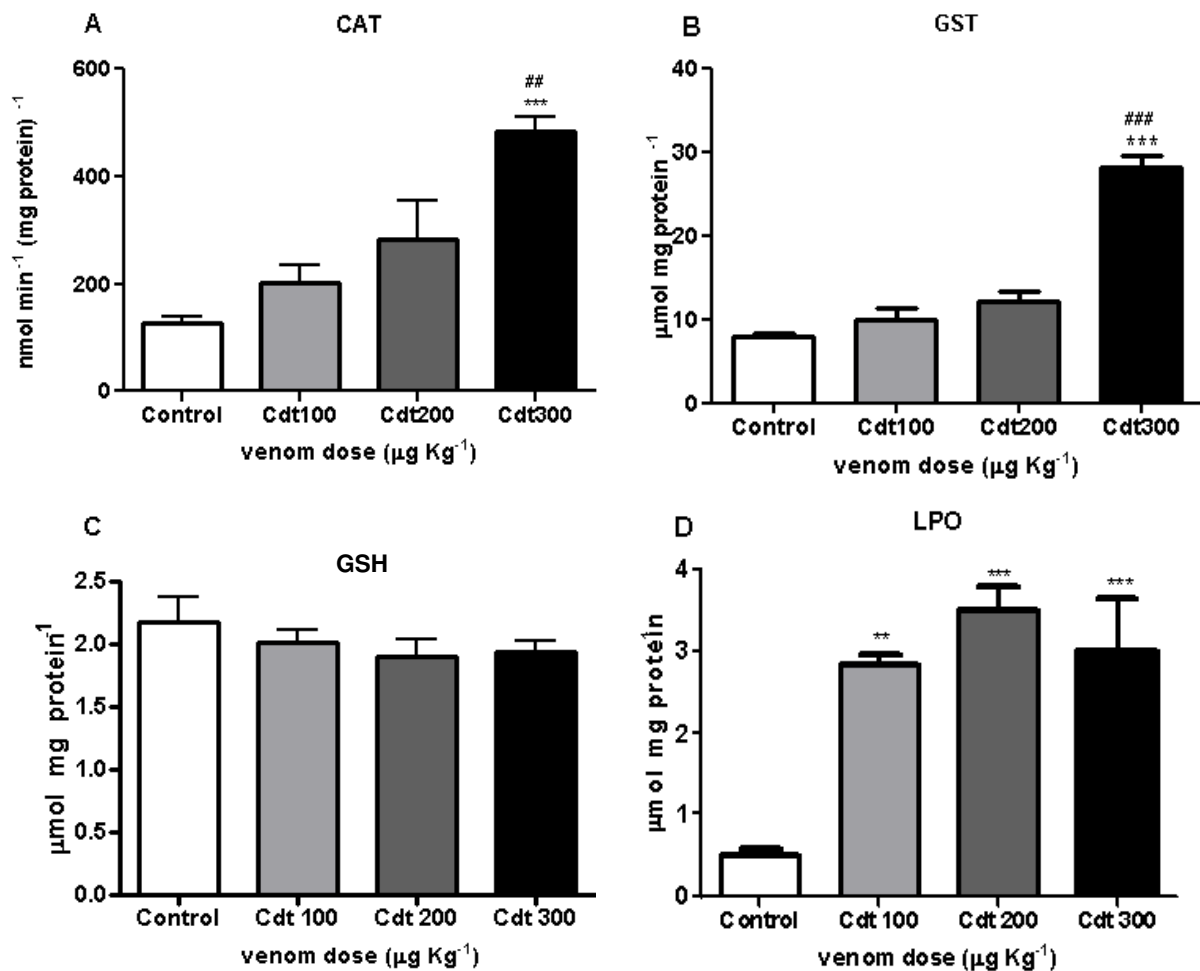


Figure 2. Effect of *Cdt* venom on CAT and GST activities, lipid peroxidation, and GSH levels. Animals were injected with saline (Control) or *Cdt* venom (100, 200 or 300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$). The activity of CAT (A) and GST (B) and the levels of GSH (C) and lipid peroxidation (D) were evaluated 3 h *post*-venom. Bars show the mean \pm mean standard errors (n=5). Symbols: *, statistically different from the control group; #, statistically different from the other venom dose group (** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, ## $p \leq 0.01$ ### $p \leq 0.001$).

3.3 Effects of *Cdt* on isolated rat liver mitochondria

The effects of *Cdt* on isolated mitochondria were investigated in experiments carried out in the presence of the uncoupler FCCP. The aim of these assays was to evaluate the effects of the venom on electron transport in intact but uncoupled

mitochondria. For this purpose the quality of the mitochondrial preparation was confirmed by RCC values, which were above 4.0 (data not shown). Figures 3A and 3B show the effects of the *Cdt* venom on oxygen consumption when glutamate plus malate or succinate were the oxidizable substrates, respectively. It can be seen that the venom promoted inhibition of oxygen consumption by $\approx 20\%$ with both substrates and in a dose-independent way.

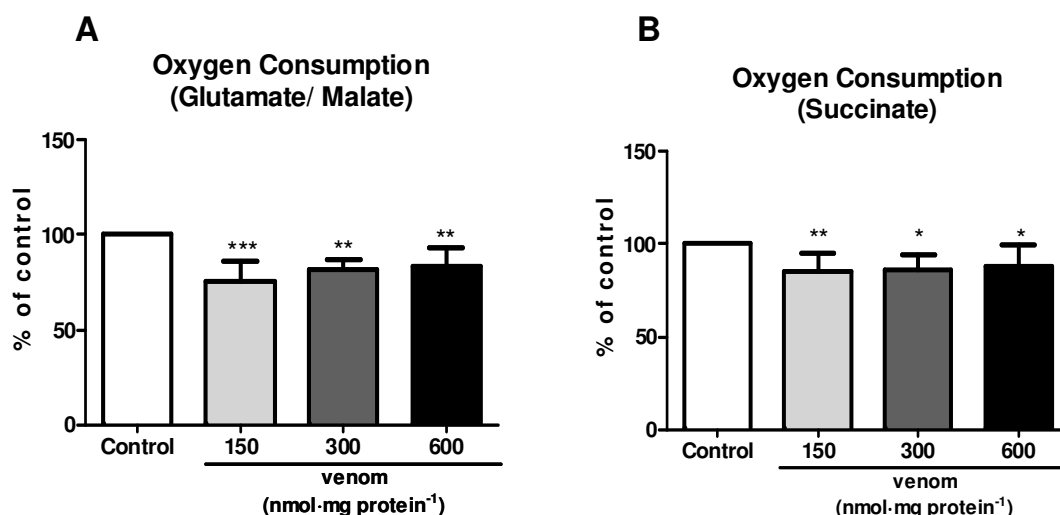


Figure 3. Effect of *Cdt* venom on oxygen consumption of uncoupled mitochondria. The substrates were glutamate plus malate (A) or succinate (B). Oxygen uptake was determined in isolated liver mitochondria of healthy and untreated rats as described in Material and Methods. Bars show the mean \pm mean standard errors of the percentage of Control. In (A) 100% of activity corresponds to 29.58 ± 3.26 nmol oxygen consumption per min per mg of protein; in (B) 100% corresponds to 27.66 ± 4.61 nmol oxygen consumption per min per mg of protein. Symbols: **, statistically different from the control group (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

3.4 Effects of the *Cdt* venom on alanine metabolism

Considering the elevated plasma levels of AST and ALT, and the alterations observed in mitochondrial respiration and oxidative stress parameters, an action of the *Cdt* venom on the liver physiology can be expected. In order to analyze the effects of the venom on hepatic metabolism, isolated liver perfusion was used for evaluating gluconeogenesis and ureagenesis with alanine (2.5 mM) as the substrate.

Gluconeogenesis was estimated by the rate of glucose release, while ureagenesis and ammoniogenesis were estimated by the rates of urea and ammonia production, respectively. Lactate and pyruvate productions were also measured, as they are also indicators of alanine metabolism. The changes in the alanine metabolism caused by various doses of the *Cdt* venom are shown in table 1 and figure 4. Table 1 presents the final increments caused by alanine in the parameters shown in figure 4 as well as those in urea and glucose production and oxygen consumption. These increments were calculated as [final values at the end of the alanine infusion period] – [basal rates before alanine infusion] and represent, thus, the liver response to alanine.

Figure 4 shows the time-course of the changes in three selected parameters in livers of saline and *Cdt* venom-injected rats. The latter ones were injected with doses of 300, 700 and 1,500 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$. Glucose release was minimal before alanine infusion due to low glycogen levels in the fasted rats. The production of glucose, pyruvate, lactate, ammonia and urea, and the consumption of oxygen increased progressively during the infusion of alanine, independent of the treatment applied previously to the rats. However, the livers of the rats inoculated with the venom presented some differences when compared to livers that were saline injected. Gluconeogenesis and oxygen uptake presented some tendency toward smaller values in livers of rats injected with 700 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$, but without statistical significance (Table 1). The highest dose of the venom, 1,500 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$, caused a significant increase in alanine transformation, as evidenced by the increases in lactate (+60%), pyruvate (+77%) and ammonia productions. The latter increased 3-fold when compared to the control group. Despite the increase in ammonia release, urea production was not affected by the venom.

Table 1. Influence of the *Cdt* venom on hepatic alanine metabolism.

| Metabolic parameters: changes upon 2.5 mM alanine infusion | Control (n=5) | <i>Cdt</i> venom | | |
|---|-------------------|---|---|---|
| | | 300 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ (n=6) | 700 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ (n=6) | 1,500 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ (n=8) |
| | | $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ | | |
| Glucose production | 0.265 \pm 0.038 | 0.240 \pm 0.018 | 0.182 \pm 0.016 | 0.220 \pm 0.030 |
| Oxygen uptake | 0.404 \pm 0.052 | 0.481 \pm 0.014 | 0.334 \pm 0.049 | 0.450 \pm 0.044 |
| Lactate production | 0.322 \pm 0.046 | 0.373 \pm 0.059 | 0.341 \pm 0.032 | 0.517 \pm 0.034* |
| Pyruvate production | 0.227 \pm 0.022 | 0.276 \pm 0.020 | 0.268 \pm 0.022 | 0.402 \pm 0.033** ## |
| Ammonia production | 0.165 \pm 0.020 | 0.241 \pm 0.043 | 0.243 \pm 0.041 | 0.497 \pm 0.070** ## |
| Urea production | 0.343 \pm 0.034 | 0.311 \pm 0.046 | 0.315 \pm 0.028 | 0.389 \pm 0.021 |

Fasted rats were injected with saline (control) or *Cdt* venom (300, 700 or 1,500 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$). After 4 hours the livers were perfused according to the protocol described in Material and Methods. Samples of the effluent perfusate were collected for metabolite assays. Oxygen uptake was followed polarographically. The data represent the mean \pm mean standard errors of the changes caused by 2.5 mM alanine infusion. The latter were calculated as [final values at the end of the alanine infusion period] – [basal rates before alanine infusion]. Variance analysis was done followed by Bonferroni's test. Legends: *, differs from the control (* $p\leq 0.05$; ** $p\leq 0.01$); #, differs from the other venom dose (## $p\leq 0.01$); *Cdt*: *Crotalus durissus terrificus*.

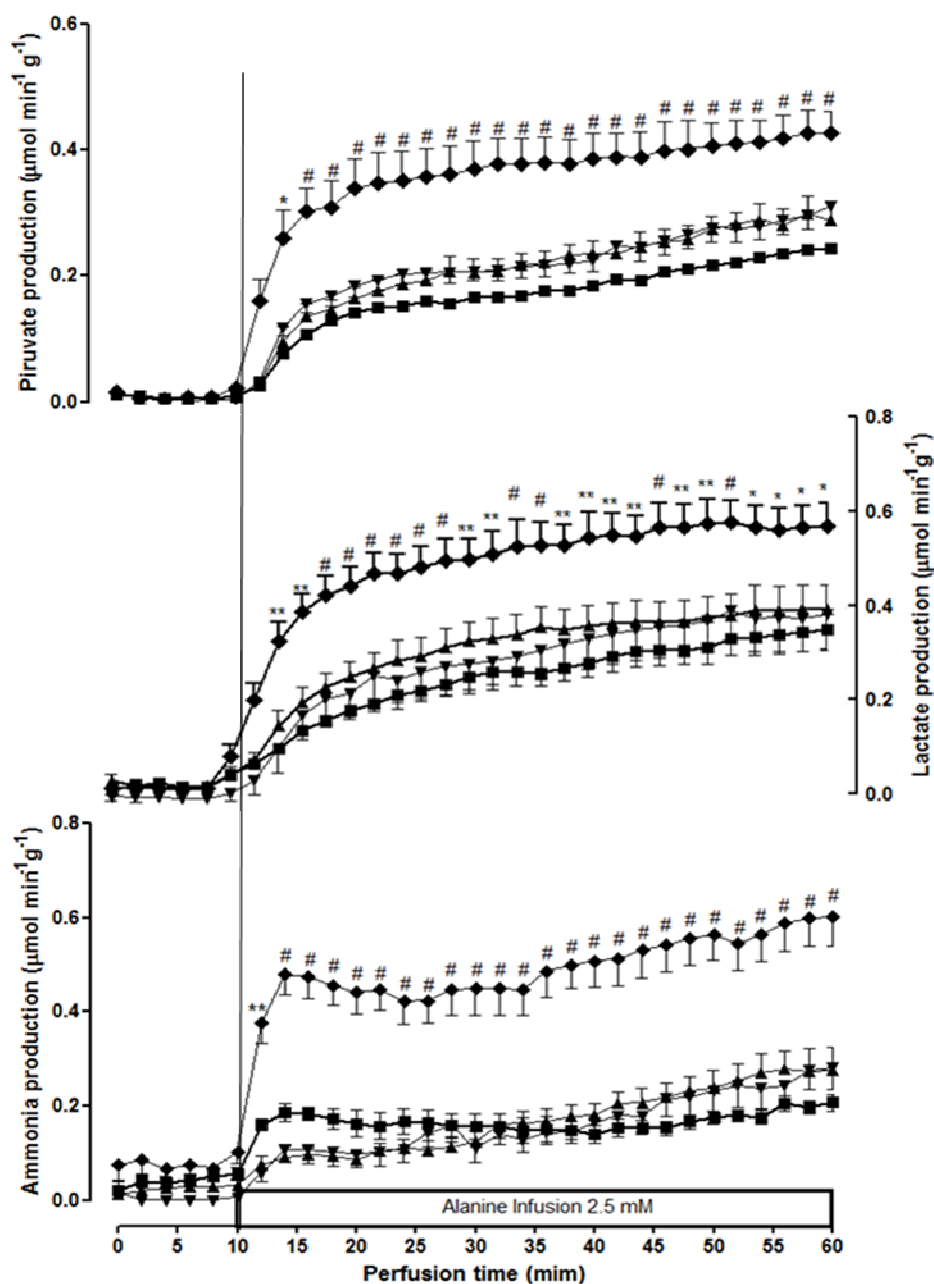


Figure 4. Time-courses of pyruvate, lactate and ammonia production of livers from rats injected with saline (controls) or *Cdt* venom. Fasted rats (20 h) were injected i.p. with saline (n=5) or venom in the doses of 300 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ (n=6), 700 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ (n=6) and 1,500 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ (n=8). After 4 h the livers were isolated and perfused in a non-recirculating system as described in item 2.6. Zero time corresponds to the time at which sampling of the perfusate was initiated after oxygen consumption stabilization. Data points are means \pm mean standard errors. Legends: \blacksquare - control; \blacktriangledown - 300 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ venom; \blacktriangle - 700 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ venom; \blacklozenge - 1,500 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ venom; * indicate statistical significance of $p \leq 0,05$; ** indicate $p \leq 0,01$ and # indicate $p \leq 0,001$ inferred from two-way variance analysis with Bonferroni test as a *post-hoc*.

4. Discussion

The results of this work show the capacity of the *Crotalus terrificus durrisus* (Cdt) venom in influencing the liver function, as it can be expected for venoms with a complex chemical composition. The raised plasma levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), both biomarkers of the liver function, confirms earlier results (França, 2004). Hepatocellular damage occurs when the membrane of hepatocytes lose integrity, releasing aminotransferases to plasma. The liver sinusoids do not have a basement membrane and the endothelium has large porosity. These anatomical particularities of the liver are probably the most important reasons for the occurrence of an early elevation of the plasma aminotranferases during hepatocellular damage, signaling a direct tissue lesion caused by acute administration of poison (Azevedo-Marques et al., 1987, Cupo et al., 1988). Enzyme release can be caused by both cell lysis and increased plasma membrane permeability (Babcock et al., 1981). Hepatic AST is located mostly in mitochondria. However, the enzyme circulating in plasma derives from the cytosol of hepatocytes, the mitochondrial AST being released only when there is massive cell necrosis. A possible cause for alterations in membrane permeability is oxidative stress. High hepatic levels of lipoperoxidation (LPO), and activity of catalase (CAT) and glutathione S-transferase (GST) are indicatives of an oxidant condition. Oxidative stress and alteration of protein contents in kidney was also reported in mice, suggesting membrane destruction, enzyme release and protein loss due to venom-direct tissue damage (Yamasaki et al., 2008).

Oxidative stress may occur when the balance that exists between the formation of reactive oxygen species (ROS) and their removal by endogenous antioxidant scavenging compounds (Gutteridge & Mitchell, 1999) is disrupted by excessive production of ROS, including $\cdot\text{O}_2$, H_2O_2 and $\cdot\text{OH}$. Alternatively, oxidative stress may also be caused by inadequate antioxidant defenses due to changes in superoxide dismutase (SOD) and CAT activities and reduced glutathione (GSH) levels (Gutteridge, 1995). The induction of CAT and GST enzymes after the venom inoculation was probably necessary for host defence. Interestingly, the GSH levels did not change at the same time as did the GST levels, but they reduced only after 6

and 9 hour *post*-venom (data not shown). Furthermore, oxidative stress is related to rhabdomyolysis, a clinical complication in *Crotalus*-bitten patients (Bucarety et al., 2002, Cupo et al., 1990, Yamasaki et al., 2008). In this situation, myoglobin degradation results in the release of free iron that catalyses ROS production, initiating lipid peroxidation and increasing the redox imbalance in kidneys. We presented evidence that hepatic CAT, GST and LPO are also target of the venom and they can be important factors driving the oxidative stress during *Cdt* intoxication. Therefore, a generalized oxidant condition seems to be present and can contribute to the *Cdt* venom toxicity.

We found that *Cdt* venom promotes inhibition of oxygen consumption in uncoupled mitochondria, which was independent of oxidizable substrates used. Although this inhibition was discrete ($\approx 20\%$) this is an important observation, since there are no data in the literature about the effects of the *Cdt* venom under this experimental condition. Previous work has described the effects of phospholipase A₂ (PLA₂) extracted from the *Cdt* venom on oxygen consumption during state 4 respiration (Valente et al., 1998). The authors observed an increase in oxygen consumption in response to the presence of fatty acids derived from membrane phospholipids. In the present study the uncoupling effect promoted by PLA₂ could not be seen since the mitochondria were already uncoupled. However, the presence of BSA in the reaction medium prevented the effects of fatty acids on oxidative phosphorylation. The inhibition of oxygen consumption by the venom suggests that other compounds, besides PLA₂, could be affecting the mitochondrial bioenergetics. In addition, this inhibition could be in part responsible for the increased oxidative stress promoted by the *Cdt* venom. In this sense, mitochondria are considered to be the most important site of production of ROS and it is well known that inhibitors of the respiratory chain promote the increase of ROS production (Adam-Vizi & Chinopoulos, 2006, Grivennikova & Vinogradov, 2006).

Considering that the liver is the organ responsible for xenobiotic biotransformation, we decided to evaluate the liver metabolism during *Cdt* intoxication. Perfusion of the isolated liver of rats injected with *Cdt* venom revealed that liver functions are affected in a relatively complex way. The productions of lactate, pyruvate and ammonia were significantly increased by the highest venom dose used in the liver perfusion

experiments ($1,500 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$). However, the doses of 300 and $700 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ did not produce significant changes in any of the evaluated metabolic parameters. This range of doses, between 300 and $1,500 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ is compatible with those used in studies performed in mice (Nonaka et al., 2008) and dogs (de Sousa-e-Silva et al., 2003), but is still lower than dose previously used in rats ($2.0 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$) (Bhattacharyya et al., 1990). The absence of significant differences in the liver metabolism with both lowest venom doses indicates that: (a) the aminotransferase release, lipoperoxidation and enzymes related to oxidative stress are more sensitive to the venom than the metabolic pathways; and (b) an overdose of venom is necessary to cause expressive metabolic modifications. The mechanism of the increased release of lactate and pyruvate, the reactants of the lactate dehydrogenase equilibrium, in consequence of alanine transformation is difficult to infer from the available data. However, there seems to be logic for the phenomenon in terms of the needs of the poisoned organism. As commented above, rhabdomyolysis and myoglobinuria are present in *Cdt* intoxication (Bucaretychi et al., 2002; de Sousa-e-Silva et al., 2003). Therefore, intense muscular activity and muscular necrosis in *Cdt* intoxication (Graça et al., 2008) can equally generate increased activity of the Cori cycle what, in turn, needs an increased supply of hepatic lactate and pyruvate. Apparently the loss of ALT by the hepatic cells was not as severe as to impair alanine transformation. This enzyme catalyzes the first step of alanine transformation and a diminution of its intracellular activity could have limited this process. It is worth to add that the increased lactate production can be related to the metabolic and respiratory acidosis, which was previously described in human patients intoxicated by *Cdt* (Amaral et al., 1991).

It is well known from experimental and clinical data that the *Cdt* venom causes impairment of kidney function and renal failure (Cupo et al., 1991; Bucaretychi et al., 2002; Yamasaki et al., 2008; Graça et al., 2008). Despite the expected uremia, the venom did not increase the hepatic production of urea. This is true at least for alanine as the ureagenic precursor. So, the uremia due *Cdt* intoxication may be a consequence of reduced urea excretion because of kidney damage. However, the liver ammonia production increased $\cong 200\%$ with the highest venom dose and $\cong 46\%$ with both lower doses. These elevations combined with no alterations in urea production are actually indicative of an increased alanine uptake. Apparently, the

liver of intoxicated animals is unable to detoxify the excess ammonia which results from this increased alanine uptake. If this results from a limitation of the urea cycle or from a limitation of the reaction catalyzed by glutamine synthase cannot be deduced from the available data. Liver zonation can also explain, partly at least, the increase in ammonia production (Mancin et al., 1998). Considering that ureagenesis from ammonia and biotransformation of xenobiotics take place in the perivenous zone of the liver acini, one should not exclude the possibility that this area is more affected by the venom than the periportal zone.

Finally, our data have shown that *Cdt* venom exerts significant effects on the liver. These effects concern metabolism, oxidative stress and mitochondrial functions. Beside these effects, recent observations have focused on the benefits of the venom components as antitumoral agent (Yan et al., 2006), analgesic agent (Giorgi et al., 1993, Brigatte et al., 2001), and as a biotechnological tool for the delivery of molecules of interest under specific conditions (Gomes et al., 2002). We evaluated the hepatic effects of the whole/crude venom, but isolated fractions could have elicited different responses. The action of the crude venom is probably the result of the concomitant action of several components. From a complex mixture one can expect synergisms and even antagonisms. Further studies with purified components of *Cdt* venom are necessary in order to obtain detailed information about its hepatic mechanisms of action and its potential biotechnology application. The present data are, therefore, more relevant for the clinical view of the *Crotalus durissus terrificus* intoxication.

Acknowledgements

We would like to express our gratitude to Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila (UFU), Dra. Kátia Moura (CIT-RS) and Mr. Candido Pereira (CPPI) for the venom processing and supplying; Irene Aparecida Bernardino and Luis Saraiva Arraes for their help in liver perfusion experiments; and thank to CAPES for Master degree fellowship supported to the first author.

References

- Adam-Vizi, V. & Chinopoulos, C. (2006). Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 639-645.
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121-126.
- Amaral, C. F., Magalhaes, R. A., & de Rezende, N. A. (1991). [Respiratory involvement secondary to crotalid ophidian bite (*Crotalus durissus*)]. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 33, 251-255.
- Azevedo-Marques, M. M., Hering, S. E., & Cupo, P. (1987). Evidence that *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) envenomation in humans causes myolysis rather than hemolysis. *Toxicon* 25, 1163-1168.
- Babcock, J. L., Suber, R. L., Frith, C. H., & Geren, C. R. (1981). Systemic effect in mice of venom apparatus extract and toxin from the brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*). *Toxicon* 19, 463-471.
- Barraviera, B., Bonjorno Junior, J. C., Arkaki, D., Domingues, M. A., Pereira, P. C., Mendes, R. P., Machado, J. M., & Meira, D. A. (1989). A retrospective study of 40 victims of crotalus snake bites. Analysis of the hepatic necrosis observed in one patient. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 22, 5-12.
- Barraviera, B., Coelho, K. Y., Curi, P. R., & Meira, D. A. (1995). Liver dysfunction in patients bitten by *Crotalus Durissus terrificus* (Laurenti, 1768) snakes in Botucatu (State of Sao Paulo, Brazil). *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 37, 63-69.
- Beghini, D. G. 2001. Isolamento e purificação de uma neurotoxina crotoxina do veneno de *Crotalus durissus cascavella*: caracterização bioquímica e biológica. Dissertação de Mestrado, Bioquímica. Unicamp, Campinas – SP.
- Bergmeyer, H. U. (1974). *Methods of enzymatic analysis*. Academic Press, London, pp. 1794-1801
- Bhattacharyya, A., Sahu, J. K., Majumdar, G., & Maity, C. R. (1990). Biochemical studies of liver & liver microsomes in envenomated rats. *Indian J. Med. Res.* 92, 374-377.
- Bracht A., Ishii-Iwamoto, E.L. (2003). *Métodos de laboratório em Bioquímica*. Manole, São Paulo, pp.275-289.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

- Brigatte, P., Hoffmann, F. A., Bernardi, M. M., Giorgi, R., Fernandes, I., Takehara, H. A., Barros, S. B., Almeida, M. G., & Cury, Y. (2001). Tolerance to the antinociceptive effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom in mice is mediated by pharmacodynamic mechanisms. *Toxicon* 39, 1399-1410.
- Bucarechi, F., Herrera, S. R., Hyslop, S., Baracat, E. C., & Vieira, R. J. (2002). Snakebites by *Crotalus durissus* ssp in children in Campinas, Sao Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 44, 133-138.
- Chance, B. & Williams, G. R. (1955). Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. II. Difference spectra. *J. Biol. Chem.* 217, 395-407.
- Cupo, P., Azevedo-Marques, M. M., & Hering, S. E. (1988). Clinical and laboratory features of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in children. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82, 924-929.
- Cupo, P., Azevedo-Marques, M. M., & Hering, S. E. (1990). Acute myocardial infarction-like enzyme profile in human victims of *Crotalus durissus terrificus* envenoming. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84, 447-451.
- Cupo, P., Azevedo-Marques, M. M. & Hering, S. E. (1991). Acidente crotálico na infância: aspectos clínicos, laboratoriais, epidemiológicos e abordagem terapêutica. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 24: 87-96.
- de Oliveira, D. G., Toyama, M. H., Martins, A. M., Havt, A., Nobre, A. C., Marangoni, S., Camara, P. R., Antunes, E., de, N. G., Beliam, L. O., Fonteles, M. C., & Monteiro, H. S. (2003). Structural and biological characterization of a crotapotin isoform isolated from *Crotalus durissus cascavella* venom. *Toxicon* 42, 53-62.
- de Sousa-e-Silva MC, Tomy, S. C., Tavares, F. L., Navajas, L., Larsson, M. H., Lucas, S. R., Kogika, M. M., & Sano-Martins, I. S. (2003). Hematological, hemostatic and clinical chemistry disturbances induced by *Crotalus durissus terrificus* snake venom in dogs. *Hum. Exp. Toxicol.* 22, 491-500.
- França, R. F. 2004. Estudo histopatológico e bioquímico induzido por veneno de *Crotalus durissus terrificus* e avaliação hepatoprotetora do diltiazem em fígado de rato Wistar. Dissertação de Mestrado. Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos.
- FUNASA – Ministério da Saúde - Brasil. 2001. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. 2.a ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 120p.
- Giorgi, R., Bernardi, M. M., & Cury, Y. (1993). Analgesic effect evoked by low molecular weight substances extracted from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon* 31, 1257-1265.

- Gomes, R. T., Camargos, R. P., Viotti, A. P., Tavares, A. P., Revelo, M. P., & Freitas, T. V. (2002). Comparison of the biodistribution of free or liposome-entrapped *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom in mice. *Comp Biochem. Physiol C. Toxicol. Pharmacol.* 131, 295-301.
- Graça, F. A. S., Peixoto, P. V., Coelho, C. D., Caldas, S. A., Tokarnia, C. H. 2008. Aspectos clínico-patológicos e laboratoriais do envenenamento crotálico experimental em bovinos. *Pesq. Vet. Bras* 28 (6):261-270.
- Grivennikova, V. G. & Vinogradov, A. D. (2006). Generation of superoxide by the mitochondrial Complex I. *Biochim. Biophys. Acta* 1757, 553-561.
- Gutteridge, J. M. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem.* 41, 1819-1828.
- Gutteridge, J. M. & Mitchell, J. (1999). Redox imbalance in the critically ill. *Br. Med. Bull.* 55, 49-75.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.
- Jiang, Z. Y., Woollard, A. C., & Wolff, S. P. (1991). Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* 26, 853-856.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Mancin, A. C., Soares, A. M., Andriao-Escarso, S. H., Faca, V. M., Greene, L. J., Zuccolotto, S., Pela, I. R., & Giglio, J. R. (1998). The analgesic activity of crostamine, a neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom: a biochemical and pharmacological study. *Toxicon* 36, 1927-1937.
- Martins, A. M., Lima, A. A., Toyama, M. H., Marangoni, S., Fonteles, M. C., & Monteiro, H. S. (2003). Renal effects of supernatant from macrophages activated by *Crotalus durissus cascavella* venom: the role of phospholipase A2 and cyclooxygenase. *Pharmacol. Toxicol.* 92, 14-20.
- Martins, A. M., Monteiro, H. S., Junior, E. O., Menezes, D. B., & Fonteles, M. C. (1998). Effects of *Crotalus durissus cascavella* venom in the isolated rat kidney. *Toxicon* 36, 1441-1450.
- Martins, A. M., Toyama, M. H., Havt, A., Novello, J. C., Marangoni, S., Fonteles, M. C., & Monteiro, H. S. (2002a). Determination of *Crotalus durissus cascavella* venom components that induce renal toxicity in isolated rat kidneys. *Toxicon* 40, 1165-1171.

- Martins, A. M., Toyama, M. H., Havt, A., Novello, J. C., Marangoni, S., Fonteles, M. C., & Monteiro, H. S. (2002b). Determination of *Crotalus durissus cascavella* venom components that induce renal toxicity in isolated rat kidneys. *Toxicon* 40, 1165-1171.
- Miyabara, E. H., Baptista, I. L., Lomonte, B., Selistre-de-Araujo, H. S., Gutierrez, J. M., & Moriscot, A. S. (2006). Effect of calcineurin inhibitors on myotoxic activity of crotoxin and *Bothrops asper* phospholipase A2 myotoxins in vivo and in vitro. *Comp Biochem. Physiol C. Toxicol. Pharmacol.* 143, 284-294.
- Monteiro, H. S., da Silva, I. M., Martins, A. M., & Fonteles, M. C. (2001). Actions of *Crotalus durissus terrificus* venom and crotoxin on the isolated rat kidney. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34, 1347-1352.
- Nonaka, P. N., Amorim, C. F., Paneque Peres, A. C., CA, E. S., Zamuner, S. R., Ribeiro, W., Cogo, J. C., Vieira, R. P., Dolhnikoff, M., & de Oliveira, L. V. (2008). Pulmonary mechanic and lung histology injury induced by *Crotalus durissus terrificus* snake venom. *Toxicon* 51, 1158-1166.
- Scholz, R., Hansen, W., & Thurman, R. G. (1973). Interaction of mixed-function oxidation with biosynthetic processes. 1. Inhibition of gluconeogenesis by aminopyrine in perfused rat liver. *Eur. J. Biochem.* 38, 64-72.
- Sedlak, J. & Lindsay, R. H. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* 25, 192-205.
- Valente, R. H., Novello, J. C., Marangoni, S., Oliveira, B., Pereira-da-Silva, L., & Macedo, D. V. (1998). Mitochondrial swelling and oxygen consumption during respiratory state 4 induced by phospholipase A2 isoforms isolated from the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom. *Toxicon* 36, 901-913
- Voss, D. O., Campello, A. P., & Bacila, M. (1961). The respiratory chain and the oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 4, 48-51.
- Yamasaki, S. C., Villarroel, J. S., Barone, J. M., Zambotti-Villela, L., & Silveira, P. F. (2008). Aminopeptidase activities, oxidative stress and renal function in *Crotalus durissus terrificus* envenomation in mice. *Toxicon* 52, 445-454
- Yan, C. H., Liang, Z. Q., Gu, Z. L., Yang, Y. P., Reid, P., & Qin, Z. H. (2006). Contributions of autophagic and apoptotic mechanisms to CrTX-induced death of K562 cells. *Toxicon* 47, 521-530,

4. CONCLUSÕES

Com base nos ensaios realizados com o veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus* em ratos, é possível concluir que:

- (a) Todas as doses injetadas por via intraperitoneal, de 100 a 1.500 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$, apresentaram algum efeito hepático, manifestado por elevação de transaminases plasmáticas, alteração de parâmetros indicadores de estresse oxidativo e alteração do metabolismo da alanina;
- (b) Dentre os parâmetros analisados, a liberação de aminotransferases (ALT e AST), a lipoperoxidação (LPO) e as enzimas CAT e GST, mostraram-se mais sensíveis ao veneno do que as vias metabólicas;
- (c) A alteração do metabolismo ocorreu de modo significativo apenas com a maior dose do veneno testada (1.500 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$), indicando que as vias metabólicas são bem reguladas mesmo na presença de xenobióticos;
- (d) *In vitro*, o veneno provocou inibição de aproximadamente 20% no consumo de oxigênio por mitocôndrias, de maneira dose-independente;
- (e) Conjuntamente, os dados obtidos neste trabalho indicam que o veneno Cdt provoca significantes efeitos no fígado, relacionados ao estresse oxidativo, metabolismo e funções mitocondrias.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO

ALEXANDER, G., GROTHUSEN, J., ZEPEDA, H., SCHWARTZMAN, R.J. 1988. Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme. *Toxicon*, 26: 953-960.

AZEVEDO-MARQUES, M.M., CUPO, P., COIMBRA, T.M., HERING, S.E., ROSSI, M.A., LAURE, C.J. 1985. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. *Toxicon*, 23: 631-636

BANCHER, W., ROSA, R.R., FURNALETTO, R.S. 1973. Estudo sobre a fixação eletiva e quantitativa do veneno de *Crotalus durissus terrificus* nos tecidos nervosos, renal, hepático e muscular de *Mus musculus* Linnaeus. *Mem Inst Butantan*, 37: 139-42.

BARRAVIERA, B., BONJORNIO, J.R., ARAKAKI, D., DOMINGUES, M.A.C., PEREIRA, P.C.M., MENDES, R.P., MACHADO, J.M., MEIRA, D.A. 1989. A retrospective study of 40 victims of *Crotalus* snake bites. Analysis of the hepatic necrosis observed in one patient. *Rev Soc Bras Med Trop*, 22(1): 5-12.

BARRAVIERA, B., RABELLO-COELHO, K.Y., CURI, P.R., MEIRA, D.A. 1995. Liver dysfunction in patients bitten by *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti, 1768) snakes in Botucatu (State of São Paulo, Brazil). *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 37(1): 63-9.

BARRAVIERA, B. 1990. Acidentes por serpentes do gênero *Crotalus*. *Arq Bras Med*, 64: 14-20.

BARRAVIERA, B. 1993. Estudo clínico dos acidentes ofídicos - revisão. *J Bras Med*, 65: 209-50.

BARRAVIERA, B. 1994. Venenos Animais. Uma visão integrada. São Paulo: EPUB. 411p.

BEGHINI, D.G. 2001. Isolamento e purificação de uma neurotoxina crotoxina do veneno de *Crotalus durissus cascavella*: caracterização bioquímica e biológica. Dissertação de Mestrado, Bioquímica. Unicamp, Campinas – SP.

BILSKA, A., KRYCZK, A., WLODEK, L. 2007. The different aspects of the biological role of glutathione. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 61: 438-453.

BOCHNER, R., STRUCHINER, C.J. 2003. Snake bite epidemiology in the last 100 years in Brazil: a review. *Cad. Saude Publica*, 19: 7-16.

BUCARETCHI, F., HERRERA, S.R., HYSLOP, S., BARACAT, E.C., VIEIRA, R.J. 2002. Snakebites by *Crotalus durissus* ssp in children in Campinas, São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 44(3):133-8.

CHIPPAUX, J.P., WILLIAMS, V., WHITE, J. 1991. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon*, 29 (11): 1279-1303.

COUSIN, X., BON, C. 1997. Acetylcholinesterase from snake venoms. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* 191, 381-400.

CUPO, P., AZEVEDO-MARQUES, M.M., HERING, S.E. 1990. Acute myocardial infarction-like enzymes profile in human victims of *Crotalus durissus terrificus* envenoming. Trans Roy Soc Med Hyg, 84: 447-51.

FRANÇA, R.F. 2004. Estudo histopatológico e bioquímico induzido por veneno de *Crotalus durissus terrificus* e avaliação hepatoprotetora do diltiazem em fígado de rato Wistar. Dissertação de Mestrado. Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos.

FUNASA

<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/animaisp/bases/animaisbrnet.def>

GUTTERIDGE, J. M. & MITCHELL, J. 1999. Redox imbalance in the critically ill. Br. Med. Bull. 55: 49-75.

GUTIERREZ, V.P., KONNO, K., CHACUR, M., SAMPAIO, S.C., PICOLO, G., BRIGATTE, P., ZAMBELLI, V.O., CURY, Y. 2008. Crotalphine induces potent antinociception in neuropathic pain by acting at peripheral opioid receptors. Eur. J. Pharmac. 594: 84–92.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C. 1989. Free radicals in Biology and Medicine. Oxford: Clarendon Press, 543 p.

JORGE, M.T. & RIBEIRO, L.A. 1992. Epidemiologia e quadro clínico por cascavel-sul-americana (*Crotalus durissus*). Rev Inst Med Trop São Paulo, 34: 347-357.

KONNO, K., PICOLO, G., GUTIERREZ, V.P., BRIGATTE, P., ZAMBELLI, V.O., CAMARGO, A.C.M., CURY, Y. Crotalphine, a novel potent analgesic peptide from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. 2008. Peptides, 29: 1293–1304.

MANCIN, A.C., SOARES, A.M., ANDRIO-ESCARSO, S.H., FACA, V.M., GREENE, L.J., ZUCCOLOTTO, S., PELA, I.R., GIGLIO, J.R. 1998. The analgesic activity of crotamine, a neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom: a biochemical and pharmacological study. Toxicon, 36: 1927-1937.

MARTINS, A.M., TOYAMA, M.H., HAVT, A., NOVELLO, J.C., MARANGONI, S., FONTELES, M.C., MONTEIRO, H.S. 2002. Determination of *Crotalus durissus cascavella* venom components that induce renal toxicity in isolated rat kidneys. Toxicon, 40(8): 1165-171.

MARTINS, A.M., MONTEIRO, H.S., JÚNIOR, E.O., MENEZES, D.B., FONTELES, M.C. 1998. Effects of *Crotalus durissus cascavella* venom in the isolated rat kidneys. Toxicon, 36(10): 141-50.

MARTINS, A.M., LIMA, A.A., TOYAMA, M.H., MARANGONI, S., FONTELES, M.C., MONTEIRO, H.S. 2003. Renal effects of supernatant from macrophages activated by *Crotalus durissus cascavella* venom: the role of phospholipase A₂ and cyclooxygenase. Pharmacology & Toxicology, 92: 14-20.

- MARTINS, A.M., NOBRE, A.C., ALMEIDA, A.C., BEZERRA, G., LIMA, A.A., FONTELES, M.C., MONTEIRO, H.S. 2004. Thalidomide and pentoxifyline block the renal effects of supernatants of macrophages activated with *Crotalus durissus cascavella* venom. *Braz J Med Biol Res*, 37(10): 1525-30.
- MIYABARA, E.H., TOSTES, R.C., SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S., AOKI, M.S., MORISCOT, A.S. 2004. Role of nitric oxide in myotoxic activity induced by crotoxin in vivo. *Toxicon*, 43(4): 425-32.
- MONTEIRO, H.A.S., DA SILVA, I.M., MARTINS, A.M., FONTELES, M.C. 2001. Actions of *Crotalus durissus terrificus* venom and crotoxin on the isolated rat kidney. *Braz J Med Biol Res*, 34: 1347-52.
- NOGUEIRA, R.M.B & SAKATE, M. 2004. Acidentes crotálicos em animais domésticos. *Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária*, 31:47-56.
- PINHO, F.M., ZANETTA, D.M., BURDMANN, E.A. 2005. Acute renal failure after *Crotalus durissus* snakebite: a prospective survey on 100 patients. *Kidney Int*, 67(2): 659-67.
- PINHO, F.M.O., OLIVEIRA, E.S., FALEIROS, F. 2004. Acidente ofídico no estado de Goiás. *Rev Assoc Med Bras*, 50(1): 93-6.
- PINHO, F.M. & PEREIRA, I.D., 2001. Snake bites. *Rev Assoc Med Bras*, 47(1): 24-29.
- PRADO-FRANCESCHI, J., BRAZIL, O.V., 1981. Convulxin, a new toxin from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon*, 19: 875-887.
- RODRIGUEZ-ACOSTA, A., PULIDO-MENDEZ, M., FINOL, H.J., GIRÓN, M.E., AGUILAR, I. 1999. Liver ultrastructural pathology in mice envenomed with uracoan rattlesnake (*Crotalus vegrandis*) venom. *J Submicrosc Cytol Pathol*, 31(3): 433-9.
- RUSSEL, F.E. 1996. Toxic effects of animal toxins. In: KLAASSEN, C.D. (Ed). Casarett and Doull's Toxicology – The Basic Science of Posion. 5th ed. New York: McGraw-Hill, p.801-839.
- SAKATE, M. 2002. Terapêutica das intoxicações. In: ANDRADE, S.F. Manual de terapêutica veterinária. São Paulo: Roca.
- SAMPAIO, S.C. BRIGATTE, P., SOUSA-E-SILVA, M.C., DOS-SANTOS, E.C., RANGEL-SANTOS, A.C., CURI, R., CURY, Y. 2003. Contribution of crotoxin for the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom on macrophage function. *Toxicon*, 41(7): 899-907.
- SCHMIDT, M.E., ABDELBAKI, Y.Z., TU, A.T. 1976. Nephrotoxic action of rattlesnake and sea snake venoms: an electron-microscopic study. *J Pathol*, 118(2): 75-81.
- SEKI, C., VIDAL, J.C., BARRIO, A. 1980. Purification of gyroxin from a South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom. *Toxicon*, 18: 235-247.

SIES, H. 1991: Oxidative stress: from basic research to clinical application. Am J Med, 91: 31S-38S

SLATER, T.F. 1984. Free radical mechanisms in tissue injury. Biochem J, 222:1-15.

STORER, T.I., USINGER, R.L., STEBBINS, R.C., NYBAKKEN, J. W. 2002. Zoologia geral. 8ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional.

VALENTE, R.H., NOVELLO, J.C., MARANGONI, S., OLIVEIRA, B., PEREIRA-DASILVA, L., MACEDO, D.V. 1998. Mitochondrial swelling and oxygen consumption during respiratory state 4 induced by phospholipase A₂ isoforms isolated from the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom. Toxicon, 36(6): 901-13.

YAMASAKI, S.C., VILLARROEL, J.S., BARONE, J.M., ZAMBOTTI-VILLELA, L., SILVEIRA, P.F. 2008. Aminopeptidase activities, oxidative stress and renal function in *Crotalus durissus terrificus* envenomation in mice. Toxicon, 52(3):445-54.

ZHAO, Q., WANG, N., JIA, R., ZHANG, S., MIAO, J. 2004. Integrin beta 4 is a target of rattlesnake venom during inducing apoptosis of vascular endothelial cells. Vasc Pharmacol, 41(1): 1-6.